

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-166547

(43)Date of publication of application : 20.06.2000

(51)Int.Cl. C12N 9/80
 C12N 1/15
 C12N 15/09
 //(C12N 9/80
 C12R 1:66)
 (C12N 9/80
 C12R 1:69)
 (C12N 1/15
 C12R 1:69)
 (C12N 15/09
 C12R 1:66)
 (C12N 15/09
 C12R 1:69)

(21)Application number : 10-347127

(71)Applicant : AICHI PREFECTURE
 ICHIBIKI KK

(22)Date of filing : 07.12.1998

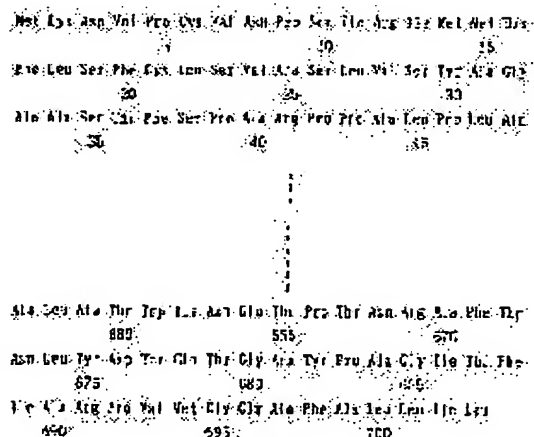
(72)Inventor : KITAMOTO NORIYUKI
 YOSHINO SHOKO
 ITO HOMARE
 AZEYANAGI TAKASHI
 TAKEDA KAYOKO

(54) NOVEL GLUTAMINASE, AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain novel glutaminase, stable over a wide pH range, high in heat resistance and useful for production of soy sauce, miso or the like, by providing it with specific properties.

SOLUTION: This glutaminase has the following properties; function: acting on L-glutamine to produce L-glutamic acid; optimum pH: approximately 8.5; pH range in which it is stable: 3 to 11, when incubated at 4° C for 24 h; optimum working temperature: approximately 50° C, when measured at pH 8.0; temperature at which it is stable: 45° C or lower, when incubated at pH 8.0 for 30 min; and molecular weight: approximately 73,000, determined by gel permeation. It is preferable that this glutaminase has an amino acid sequence of amino acids 34 to 703 in the sequence shown by the formula, and that it is produced by culturing the host cell genetically transformed by a manifestation vector containing DNA coding for the glutaminase.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-166547

(P2000-166547A)

(43) 公開日 平成12年6月20日 (2000. 6. 20)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード (参考)
C 1 2 N 9/80		C 1 2 N 9/80	Z 4 B 0 2 4
1/15		1/15	4 B 0 5 0
15/09	Z N A	15/00	Z N A A 4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 9/80			
C 1 2 R 1:66)			

審査請求 未請求 請求項の数23 O L (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-347127

(22) 出願日 平成10年12月7日 (1998. 12. 7)

(71) 出願人 000116622

愛知県

愛知県名古屋市中区三の丸3丁目1番2号

(74) 上記1名の復代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外5名)

(71) 出願人 591175332

イチビキ株式会社

愛知県名古屋市中区熱田区新尾頭1丁目11番6号

(74) 上記1名の代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規グルタミナーゼ及びその製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 新規なグルタミナーゼの提供。

【解決手段】 特定の2種類のうちのいずれかのアミノ酸配列を有するか、又はそれに対して修飾されたアミノ酸配列を有するグルタミナーゼ。該グルタミナーゼは、例えばアスペルギルス属微生物から得られる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の性質：

(1) 作用：L-グルタミンに作用してL-グルタミン酸を生成する；

(2) 至適pH：至適pHが約8.5である；

(3) 安定pH範囲：4℃にて24時間インキュベートした場合、安定pH範囲はおおよそ3～11である；

(4) 至適作用温度：pH8.0において測定した場合、至適作用温度は約50℃である；

(5) 温度安定性：pH8.0にて30分間インキュベートした場合、45℃以下の温度で安定である；

(6) 分子量：ゲル濾過により測定した場合、分子量は約73,000である；を有するグルタミナーゼ。

【請求項2】 配列番号：2に示すアミノ酸配列において、アミノ酸34～703のアミノ酸配列を有するグルタミナーゼ。

【請求項3】 配列番号：2に示すアミノ酸配列中のアミノ酸番号34～703のアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は置換により修飾されたアミノ酸配列を有し、且つグルタミナーゼ活性を有する修飾されたグルタミナーゼ。

【請求項4】 配列番号：1に示す塩基配列を有する核酸とストリンジент条件下でハイブリダイズすることができる核酸によりコードされているグルタミナーゼ。

【請求項5】 配列番号：2に示すアミノ酸配列中のアミノ酸番号34～703のアミノ酸配列に対して70以上%の相同性を有するアミノ酸配列を有するグルタミナーゼ。

【請求項6】 配列番号：4に示すアミノ酸配列において、アミノ酸34～703のアミノ酸配列を有するグルタミナーゼ。

【請求項7】 配列番号：4に示すアミノ酸配列中のアミノ酸番号34～703のアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は置換により修飾されたアミノ酸配列を有し、且つグルタミナーゼ活性を有する修飾されたグルタミナーゼ。

【請求項8】 配列番号：3に示す塩基配列を有する核酸とストリンジент条件下でハイブリダイズすることができる核酸によりコードされているグルタミナーゼ。

【請求項9】 配列番号：4に示すアミノ酸配列中のアミノ酸番号34～703のアミノ酸配列に対して70以上%の相同性を有するアミノ酸配列を有するグルタミナーゼ。

【請求項10】 請求項2～5のいずれか1項に記載のグルタミナーゼをコードするDNA。

【請求項11】 イントロンを含んで成る請求項10に記載のDNA。

【請求項12】 ゲノムDNAである請求項11に記載のDNA。

【請求項13】 請求項6～9のいずれか1項に記載の

グルタミナーゼをコードするDNA。

【請求項14】 イントロンを含んで成る請求項13に記載のDNA。

【請求項15】 ゲノムDNAである請求項14に記載のDNA。

【請求項16】 請求項10～12のいずれか1項に記載のDNAを含んで成るベクター。

【請求項17】 請求項13～15のいずれか1項に記載のDNAを含んで成るベクター。

【請求項18】 請求項16に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項19】 請求項17に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項20】 請求項1に記載のグルタミナーゼの製造方法において、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属し、該グルタミナーゼを生産することができる微生物を培養し、培養物からグルタミナーゼを採取することを特徴とする方法。

【請求項21】 前記微生物が、アスペルギルス・ソセー (*Aspergillus sojae*) 又はアスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) である、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 請求項2～5のいずれか1項に記載のグルタミナーゼの製造方法において、該グルタミナーゼをコードするDNAを含んで成る発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、該培養物から、該グルタミナーゼを採取することを特徴とする方法。

【請求項23】 請求項6～9のいずれか1項に記載のグルタミナーゼの製造方法において、該グルタミナーゼをコードするDNAを含んで成る発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、該培養物から該グルタミナーゼを採取することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、新規なグルタミナーゼ、該グルタミナーゼをコードする遺伝子系、及び該グルタミナーゼの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 グルタミナーゼ (Glutaminase) [EC3.5.1.2] はグルタミンからグルタミン酸を生成する酵素であり、特に、麹菌が生成するグルタミナーゼは醤油や味噌などの醸造中に旨味を高めるなどの重要な役割を果たしている。(板倉辰一郎 編著、醤油の化学と技術、p. 181、日本醸造協会 (1988)) また、麹菌のグルタミナーゼについては精製され、その性質が検討されている。(T. Yano, M. Ito, K. Tomita, H. Kumagai, and T. Tochikura, J. Ferment. Technol., 66, 137-143 (1988)) しかし、分子生物学的手法を用いたアプローチは未だされていない。また、このグルタミナーゼは、安定pH範囲が狭い、温度安定性が低い、等のた

め、工業的利用の面で限界があった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は、安定pH範囲が広く、且つ温度安定性が高い新規なグルタミナーゼを提供しようとするものである。本発明はさらに、上記のグルタミナーゼの製造方法を提供し、またその手段として、該グルタミナーゼをコードする遺伝子系を提供するものである。従って本発明は、(A)次の性質：

(1) 作用：L-グルタミンに作用してL-グルタミン酸を生成する；

(2) 至適pH：至適pHが約8.5である；

(3) 安定pH範囲：4℃にて24時間インキュベートした場合、安定pH範囲はおよそ3～11である；

(4) 至適作用温度：pH8.0において測定した場合、至適作用温度は約50℃である；

(5) 温度安定性：pH8.0にて30分間インキュベートした場合、45℃以下の温度で安定である；

(6) 分子量：ゲル濾過により測定した場合、分子量は約73,000である；を有するグルタミナーゼを提供する。

【0004】本発明はまた、(B)配列番号：2に示すアミノ酸配列において、アミノ酸34～703のアミノ酸配列を有するグルタミナーゼ；配列番号：2に示すアミノ酸配列中のアミノ酸番号34～703のアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は置換により修飾されたアミノ酸配列を有し、且つグルタミナーゼ活性を有する修飾されたグルタミナーゼ；配列番号：1に示す塩基配列を有する核酸とストリンジент条件下でハイブリダイズすることができる核酸によりコードされているグルタミナーゼ；並びに配列番号：2に示すアミノ酸配列中のアミノ酸番号34～703のアミノ酸配列に対して70以上%の相同性を有するアミノ酸配列を有するグルタミナーゼを提供する。

【0005】本発明はさらに、(C)配列番号：4に示すアミノ酸配列において、アミノ酸34～703のアミノ酸配列を有するグルタミナーゼ；配列番号：4に示すアミノ酸配列中のアミノ酸番号34～703のアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は置換により修飾されたアミノ酸配列を有し、且つグルタミナーゼ活性を有する修飾されたグルタミナーゼ；配列番号：3に示す塩基配列を有する核酸とストリンジент条件下でハイブリダイズすることができる核酸によりコードされているグルタミナーゼ；並びに配列番号：4に示すアミノ酸配列中のアミノ酸番号34～703のアミノ酸配列に対して70以上%の相同性を有するアミノ酸配列を有するグルタミナーゼを提供する。

【0006】本発明はまた、前記(B)に記載のグルタミナーゼをコードするDNA、該DNAを含んで成るベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主細胞

を提供する。本発明はまた前記(C)に記載のグルタミナーゼをコードするDNA、該DNAを含んで成るベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主細胞を提供する。本発明はさらに、前記Aに記載のグルタミナーゼの製造方法において、アスペルギルス(*Aspergillus*)属に属し、該グルタミナーゼを生産することができる微生物を培養し、培養物からグルタミナーゼを採取することを特徴とする方法を提供する。

【0007】前記微生物は、例えば、アスペルギルス・ソヤ(*Aspergillus sojae*)又はアスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)である。本発明はまた、前記(B)に記載のグルタミナーゼの製造方法において、該グルタミナーゼをコードするDNAを含んで成る発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、該培養物から、該グルタミナーゼを採取することを特徴とする方法を提供する。本発明はさらに、前記(C)に記載のグルタミナーゼの製造方法において、該グルタミナーゼをコードするDNAを含んで成る発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、該培養物から該グルタミナーゼを採取することを特徴とする方法を提供する。

【0008】

【発明の実施の形態】(1)微生物

本発明の微生物、すなわち、本発明のグルタミナーゼの発酵生産に利用する微生物、及び本発明のグルタミナーゼをコードする遺伝子の分離源としての微生物としては、本発明のグルタミナーゼを生産することができる微生物であればよいが、好ましくはアスペルギルス(*Aspergillus*)属の微生物であり、さらに好ましくは、アスペルギルス・ソヤ(*Aspergillus sojae*)又はアスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)である。

【0009】これらの種の具体的な菌株としては、アスペルギルス・ソヤ(*Aspergillus sojae*) BA-104、アスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*) KBN616を挙げることができる。なお、アスペルギルス・ソヤ株は、醤油や味噌の製造のために広く使用されまた市販されている麹菌を単孢子分離等の常法に従って純化することにより容易に得られる。また、アスペルギルス・オリゼ株は、清酒用として広く使用されまた市販されている麹菌を単孢子分離等の常法に従って純化することによっても容易に得られる。

【0010】(2)グルタミナーゼの精製

本発明のグルタミナーゼは、該グルタミナーゼを生産することができる微生物、好ましくは上に記載した微生物を常法に従って培養し、そして酵素の精製に用いられる常法に従って培養物から回収(採取)することができる。培養は液体培地でも固体培地でもよく、例えばフスマの固体培地において培養するのが好ましい。本発明のグルタミナーゼの発酵生産方法の一例を、アスペルギルス・ソヤBA-104株を使用した場合について、実

施例1に具体的に記載する。

【0011】(3) グルタミナーゼの性質

(a) 活性測定法及びユニットの定義

本発明のグルタミナーゼは、L-γ-グルタミル-p-ニトロアニリドを基質として使用し、グルタミナーゼの作用により遊離するp-ニトロアニリンを比色定量することにより活性測定することができる。

【0012】具体的には、800μlの50mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)と、該緩衝液中1mM L-γ-グルタミル-p-ニトロアニリド溶液200μlとを試験管に入れ、これを30℃にて3分間予熱した後、これに200μlの被験酵素液を加えて60分間反応せしめ、400μlの1M酢酸を添加して反応を停止せしめ、405nmの吸光度を測定する。盲検として、酵素液を加えずに同様の操作を行い、反応停止後に酵素液を加えて、405nmの吸光度を測定する。上記の条件下で1分間に1μmolのp-ニトロアニリンを生じさせる酵素量を1ユニットと定義する。

【0013】次に、本発明の酵素の1例として、アスペルギルス・ソヤーBA-104から得られたグルタミナーゼの性質を次に示す。

(b) 至適pH

緩衝液900μl (pH5.0～7.0: 25mM Na₂HPO₄-KH₂PO₄; pH7.0～9.5: 25mM Tris-HCl; pH9.5～12.0: 25mM Na₂B₄O₇-H₂O)に酵素液100μlを加え、30℃にて60分間反応せしめ、最高活性を100として、各pHにおける相対活性を求める。結果を図1に示す。この結果から明らかな通り、至適pHは約8.5である。

【0014】(c) pH安定性

250μlの緩衝液 (pH1.0～5.0: 25mM HCl-CH₃COONa; pH5.0～7.0: 25mM Na₂HPO₄-KH₂PO₄; pH7.0～9.5: 25mM Tris-HCl; pH9.5～12.0: 25mM Na₂B₄O₇-H₂O)に酵素液100μlを加え、4℃にて24時間インキュベートし、50mM Tris-HCl (pH8.0)緩衝液中で(a)に記載したようにして活性を測定し、最高活性を100として各インキュベーションpHにおける活性の相対値を求める。結果を図2に示す。この結果から明らかな通り、上記の条件下でおよそpH3.0～11.0において安定である。

0: 25mM Tris-HCl; pH10.0～12.0: 25mM Na₂B₄O₇-NaOH)に250μlの酵素液を加え、4℃にて24時間インキュベートし、50mM Tris-HCl (pH8.0)緩衝液中で(a)に記載したようにして活性を測定し、最高活性を100として各インキュベーションpHにおける活性の相対値を求める。結果を図2に示す。この結果から明らかな通り、上記の条件下でおよそpH3.0～11.0において安定である。

【0015】(d) 至適温度

50mM Tris-HCl (pH8.0)緩衝液中で20℃～60℃にて活性を測定し、最高値を100として各温度における相対活性値を求める。結果を図3に示す。この結果から明らかな通り、至適温度は約50℃であり、40℃～50℃において高い活性を示す。

【0016】(e) 温度安定性

酵素を50mM Tris-HCl (pH8.0)緩衝液中で20℃～60℃にて30分間インキュベートした後、50mM Tris-HCl (pH8.0)緩衝液中30℃にて活性を測定し、30分間のインキュベーションなしのサンプルを100として各インキュベーション温度における相対活性値を求める。結果を図4に示す。この結果から、本発明の酵素は、上記の条件において、約45℃以下において安定である。

(f) 基質特異性

前記活性測定法(a)に記載した条件下で、反応液に基質として各種試薬を添加して酵素活性を測定し、L-γ-グルタミンに対する活性を100として相対活性を求めた結果は次の表1に示す通りである。

【0017】

【表1】

表1

基質特異性

基質 (1 mM)	相対活性 (%)
L-グルタミン*	100.0
D-グルタミン*	0.0
L-アスパラギン*	0.0
D-アスパラギン*	0.0
L-セアニン(Theanine)*	59.5
グルタチオン*	97.6
L-γ-グルタミル-p-ニトロアニリド	72.0
Glu-Glu*	0.0
Glu-Asp*	0.0

*: 酵素活性は、アミノ酸分析計(LC-10ADアミノ酸分析システム、島津製作所製)を用いて基質の減少スピードを測定した。

【0018】本酵素はL-グルタミン及びグルタチオン

に対して高い反応性を示し、L-セアニンに対してはL

ーグルタミンに比べて約60%の反応性を示すが、D-グルタミン、L-アスパラギン、D-アスパラギン等に対しては実質的に反応性を示さない。

【0019】(g) 金属イオンの影響

精製した酵素の反応時における金属イオンの影響を調べた。本酵素は Cu^{2+} で約75%の阻害を受けたほかは、金属イオンによる阻害はほとんど見られなかった。結果を次の表に示す。

【0020】

【表2】

表2
金属イオンの影響

添加物 (1 mM)	相対活性 (%)
無添加	100.0
NaCl	101.7
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	105.8
$\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	103.5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	105.8
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	95.9
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	77.3
HgCl_2	82.6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	26.2

【0021】(h) 分子量

HPLCによるゲル濾過法(カラム: YMC-Pack Diol-20 06mm×300mm; 移動相: 50mM Tris-HCl (pH7.0) 中 0.1M NaCl; 流速: 0.5ml/分; 温度: 室温(23℃); 注入量: 20μl; 標準蛋白質: ウシ血清アルブミン (M.W. 66,000)、オバルブミン (M.W. 42,000)、大豆トリプシンインヒビター (M.W. 20,000))において、約73,000の分子量を示し、Laemmli法による10%ゲル上SDS-PAGE(標準蛋白質: SDS-PAGEスタンダードLow (バイオラッド社製))において、約83,000の分子量を示す。

【0022】上記の本発明の酵素(アスペルギルス・ソヤーBA-104)とT.Yanoら、J. Ferment. Technol. Vol. 66, p. 138 (1988)に記載されているアスペルギルス・オリゼーMA-27由来のグルタミナーゼ(細胞内酵素及び細胞外酵素)とを比較すれば次の表3に示す通りである。

【0023】

【表3】

表3

性質	Aspergillus oryzae MA-27		Aspergillus sojae BA-104
	細胞内	細胞外	細胞外
分子量	113,000 (ゲル濾過)	113,000 (ゲル濾過)	83,000(SDS-PAGE) 73,000(ゲル濾過)
至適pH	pH 9	pH 9	pH 8.5
至適温度	45℃	45℃	50℃
pH安定性	pH7~10(80%以上、4℃)		pH3~11(80%以上、4℃)
温度安定性	37℃以下(pH7.2, 10分)		45℃以下(pH8, 30分)

【0024】この表から明らかな通り、両者は、分子量、至適pH、pH安定性、至適温度、温度安定性等の点で明らかに異り、本発明の酵素は既知酵素に比べて、温度安定性及びpH安定性の点で優れている。

【0025】配列番号: 1に示す塩基配列はアスペルギルス・オリゼーKBN616株のゲノムDNAの塩基配列であり、塩基番号の845~847のATG(アミノ酸番号1のMet)が翻訳開始コドンである可能性があり、塩基番号884~886のATG(アミノ酸番号14のMet)が翻訳開始コドンである可能性があり、また塩基番号887~889のATG(アミノ酸番号15のMet)が翻訳開始コドンである可能性もある。

【0026】他方、このゲノムDNAを含有する発現ベクターによりアスペルギルス・オリゼーKBN616-39(niaD-)株を形質転換し、該導入したゲノムDNAを発現せしめたところ(実施例3)、その発現生成物はグルタミナーゼ活性を有し、実施例1において精製したグルタミナーゼと同じ分子量を示し、この発現生成物のN-末端配列はAla-Ser-Thr-Phe-Ser-Pro-Ala-Arg-Pro-Pro-Ala-Leu(配列番号: 5)であり、配列番号: 1及び配列番号: 2に示すアミノ酸配列の34位のアミノ酸(Ala)から下流のアミノ酸配列に相当する。

【0027】従って、配列番号: 1及び配列番号: 2に

記載のアミノ酸配列において、アミノ酸番号34のAlaから703位のLeuまでがグルタミナーゼの成熟蛋白質であり、33位のAlaから上流のアミノ酸配列はシグナル配列である可能性がある。また、配列番号：1又は配列番号：2のアミノ酸配列において34位のAlaから703位のLeuまでのアミノ酸配列が、グルタミナーゼ活性のために十分であることがわかる。従って、本発明は、配列番号：1又は配列番号：2における、少なくとも34位のAlaから703位のLeuまでのアミノ酸配列を有するグルタミナーゼを提供する。

【0028】しかしながら、ある酵素がその酵素活性を発揮するには、生来のアミノ酸配列のすべてがそのまま必要なわけではなく、活性の発現に必須の領域以外の領域においては、アミノ酸の欠失、付加、置換等によりアミノ酸配列が修飾されていても本来の酵素活性を発揮することが知られている。従って本発明は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列における第34位のAlaから第703位のLeuまでのアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つグルタミナーゼ活性を維持している修飾型グルタミナーゼを提供する。

【0029】上記の修飾の程度は、PCR、部位特定変異誘発等、周知技術により修飾できる程度であり、且つグルタミナーゼ活性を喪失しない範囲である。例えば、配列番号：2に記載の第34位のAlaから第703位のLeuまでのアミノ酸配列に対して、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、又は95%以上の相同性を有するものである。従って本発明はまた、配列番号：2に記載の第34位のAlaから第703位のLeuまでのアミノ酸配列に対して、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、又は95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、且つグルタミナーゼ活性を維持している修飾型グルタミナーゼを含む。

【0030】一旦、酵素をコードする生来の生来のゲノムDNA又はcDNAがクローニングされれば、該ゲノムDNA特にそのエクソン部分もしくはcDNA、又はそれらの一部分をプローブとして用いることにより、同じ酵素活性を有する他の蛋白質をコードするDNAを選択することができる。従って、本発明は、配列番号：1に示す塩基配列を有する核酸、例えばDNA、特にエクソン部分の配列を有する核酸、例えばDNA、例えばゲノムDNA又はcDNA、あるいはそれらの断片、例えば好ましくは15塩基以上、さらに好ましくは20塩基以上、例えば30塩基以上の長さの断片とハイブリダイズすることができる核酸によりコードされており、且つグルタミナーゼ活性を有する蛋白質をも提供する。

【0031】上記の場合のハイブリダイゼーション条件は、例えば、野村慎太郎、稲澤譲治著「脱アイソトープ実験プロトコル」p. 40（秀潤社、1994）に記載の条件の条件（500mM NaPi緩衝液（pH7、

2）、7%SDS、1mM EDTA）である。上記ハイブリダイゼーションによるスクリーニングの対象となる核酸は特に限定される。例えば合成DNAや、生来のDNAを前記のごとく修飾したものでよいが、天然のDNA、例えば、ゲノムDNAやcDNAのライブラリーが好ましい。このようなDNAライブラリーは、例えば真菌類、例えばアスペルギルス属の微生物、例えばアスペルギルス・オリゼー、アスペルギルス・ソヤー、アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）等から、常法に従って調製することができる。あるいは、そのようなライブラリーは、他の微生物、例えば細菌、動物細胞、植物細胞等からも調製することができる。

【0032】配列番号：3に示す塩基配列はアスペルギルス・ソヤーBA-104株のゲノムDNAの塩基配列であり、塩基番号690～692のATG（アミノ酸番号1のMet）が翻訳開始コドンである可能性があり、塩基番号729～731のATG（アミノ酸番号14のMet）が翻訳開始コドンである可能性があり、さらに塩基番号732～734のATG（アミノ酸番号15のMet）が翻訳開始コドンである可能性もある。

【0033】他方、このゲノムDNAを含有する発現ベクターによりアスペルギルス・オリゼーKBN616-39（niaD⁻）株を形質転換し、該導入したゲノムDNAを発現せしめたところ（実施例5）、その発現生成物はグルタミナーゼ活性を有し、実施例1において精製したグルタミナーゼと同じ分子量を示し、この発現生成物のN-末端配列はAla-Ser-Thr-Phe-Ser-Pro-Ala-Arg-Pro-Pro-Ala-Leu（配列番号：5）であり、配列番号：3及び配列番号：4に示すアミノ酸配列の34位のアミノ酸（Ala）から下流のアミノ酸配列に相当する。

【0034】従って、配列番号：3及び配列番号：4に記載のアミノ酸配列において、アミノ酸番号34のAlaから703位のLeuまでがグルタミナーゼの成熟蛋白質であり、33位のAlaから上流のアミノ酸配列はシグナル配列である可能性がある。また、配列番号：3又は配列番号：4のアミノ酸配列において34位のAlaから703位のLeuまでのアミノ酸配列が、グルタミナーゼ活性のために十分であることがわかる。

【0035】従って、本発明は、配列番号：3又は配列番号：4における、少なくとも34位のAlaから703位のLeuまでのアミノ酸配列を有するグルタミナーゼを提供する。しかしながら、ある酵素がその酵素活性を発揮するには、生来のアミノ酸配列のすべてがそのまま必要なわけではなく、活性の発現に必須の領域以外の領域においては、アミノ酸の欠失、付加、置換等によりアミノ酸配列が修飾されていても本来の酵素活性を発揮することが知られている。従って本発明は、配列番号：4に記載のアミノ酸配列における第34位のAlaから第703位のLeuまでのアミノ酸配列において、1又

は複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つグルタミナーゼ活性を維持している修飾型グルタミナーゼを提供する。

【0036】上記の修飾の程度は、PCR、部位特定変異誘発等、周知技術により修飾できる程度であり、且つグルタミナーゼ活性を喪失しない範囲である。例えば、配列番号：2に記載の第34位のAlaから第703位のLeuまでのアミノ酸配列に対して、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、又は95%以上の相同性を有するものである。従って本発明はまた、配列番号：4に記載の第34位のAlaから第703位のLeuまでのアミノ酸配列に対して、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、又は95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、且つグルタミナーゼ活性を維持している修飾型グルタミナーゼを含む。

【0037】一旦、酵素をコードする生来の生来のゲノムDNA又はcDNAがクローニングされれば、該ゲノムDNA特にそのエクソン部分もしくはcDNA、又はそれらの一部分をプローブとして用いることにより、同じ酵素活性を有する他の蛋白質をコードするDNAを選択することができる。従って、本発明は、配列番号：3に示す塩基配列を有する核酸、例えばDNA、特にエクソン部分の配列を有する核酸、例えばDNA、例えばゲノムDNA又はcDNA、あるいはそれらの断片、例えば好ましくは15塩基以上、さらに好ましくは20塩基以上、例えば30塩基以上の長さの断片とハイブリダイズすることができる核酸によりコードされており、且つグルタミナーゼ活性を有する蛋白質をも提供する。

【0038】上記の場合のハイブリダイゼーション条件は、例えば、野村慎太郎、稲澤譲治著「脱アイソトープ実験プロトコル」p. 40（秀潤社、1994）に記載の条件の条件（500mM NaPi緩衝液（pH7.2）、7% SDS、1mM EDTA）である。上記ハイブリダイゼーションによるスクリーニングの対象となる核酸は特に限定される。例えば合成DNAや、生来のDNAを前記のごとく修飾したものでもよいが、天然のDNA、例えば、ゲノムDNAやcDNAのライブラリーが好ましい。このようなDNAライブラリーは、例えば真菌類、例えばアスペルギルス属の微生物、例えばアスペルギルス・オリゼー、アスペルギルス・ソヤー、アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）等から、常法に従って調製することができる。あるいは、そのようなライブラリーは、他の微生物、例えば細菌、動物細胞、植物細胞等からも調製することができる。

【0039】本発明はまた、前記の生来のグルタミナーゼ、又はグルタミナーゼ活性を有する蛋白質をコードする核酸、特にDNAに関する。典型的には、配列番号：1又は配列番号：3に示す塩基配列を有するゲノムDNA、又はそのエクソン部分のみから成るcDNAであ

る。ゲノムDNAのクローニング方法の1例は、実施例2及び4において具体的に記載する。

【0040】一旦、ゲノムDNAがクローニングされれば、該ゲノムDNA、又はその1部分、特にエクソン部分のDNAをプローブとして、cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより本発明のグルタミナーゼをコードするcDNAを得ることができる。cDNAライブラリーの調製及びプローブハイブリダイゼーションによるそのスクリーニングは常法に従って行うことができる。cDNAライブラリーは、例えば前記の出発材料、例えばアスペルギルス属微生物、例えばアスペルギルス・オリゼー、アスペルギルス・ソヤー、アスペルギルス・ニガー、等から調製することができる。

【0041】また、修飾されたグルタミナーゼをコードするDNAは、生来のゲノムDNA又はcDNAを基礎とし、部位特定変異誘発、PCR、ランダム変異、ジーンシャッフリング等の常法に従って行うことができる。また、1又は複数個のアミノ酸が欠失した短縮型酵素をコードするDNAは、生来のDNAに開始コドン及び／又は終止コドンを導入することによっても得られる。さらに、適当な制限酵素により、生来のDNAを切断することによっても得られる。

【0042】本発明はまた、上記のDNAを含んで成るベクター、特に発現ベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主細胞に関する。グルタミナーゼを生産するための宿主細胞としては、グルタミナーゼをコードするDNAがゲノムDNAである場合にはスプライシング活性を有する宿主細胞である必要があり、真核性細胞、例えば真菌類、例えば酵母又は糸状真菌類、又は動物細胞、さらには植物細胞が使用される。

【0043】酵母としては例えばサッカロミセス（*Saccharomyces*）属酵母、例えばサッカロミセス・セービスエー（*Saccharomyces cerevisiae*）等が挙げられ、糸状真菌類としては、例えばアスペルギルス属微生物、例えばアスペルギルス・オリゼー、アスペルギルス・ニガー、等が挙げられる。動物細胞としては、昆虫細胞、例えばカイコの細胞、哺乳類培養細胞、例えばCOS細胞等が挙げられる。さらに植物細胞を用いることもできる。さらに、グルタミナーゼをコードするDNAがcDNAである場合、上記の宿主の他に、原核性宿主、例えば細菌宿主を用いることができる。細菌宿主としては、例えば大腸菌（*Escherichia coli*）、バチルス（*Bacillus*）属細菌、例えばバチルス・ズブチリス（*Bacillus subtilis*）等の常用の宿主が用いられる。

【0044】発現ベクターは、宿主に応じて発現制御配列、例えばプロモーター、ターミネーター等を含有する必要がある。例えば、酵母用のプロモーターとしては解糖系酵素、遺伝子のプロモーター、Galプロモーター等が挙げられ、糸状菌用プロモーターとしてはAmyA

プロモーター等が挙げられ、動物細胞用プロモーターとしてはウイルスプロモーター等が用いられる。また、細菌用プロモーターとしては、ウイルスベクター用プロモーター等が用いられる。宿主としての細胞とそれに適合するベクター系の使用はすでに常用技術となっており、本発明においては、それらの既知の発現系を適宜選択して使用することができる。

【0045】本発明はまた、本発明のグルタミナーゼの製造方法を提供する。第1の態様によれば、本発明のグルタミナーゼを生産することができるアスペルギルス属微生物を培養し、該培養物から、グルタミナーゼを採取すればよい。このための生産菌としては、アスペルギルス・オリゼー、アスペルギルス・ソヤー等が挙げられ、具体例としてアスペルギルス・オリゼーKBN616株及びアスペルギルス・ソヤーBA-104株が挙げられる。

【0046】グルタミナーゼの製造のための培養は、固体培地及び液体培地のいずれでもよい。固体培地に培養する場合には、例えばフスマ等の通気性のよい材料、好ましくは植物材料に、必要に応じて、リン酸塩等の無機物、又は米糖等の有機窒素源などを添加し、20℃～35℃、好ましくは約30℃の温度で好気的に培養すればよい。また、液体培地に培養する場合には、アスペルギルス属微生物が増殖することができる任意の液体培地を使用することができる。

【0047】液体培地には、アスペルギルス属微生物が資化し得る炭素源、例えば澱粉、マルトース、グルコース等を0.1～10%、好ましくは1～5%含有せしめ、またアスペルギルス属微生物が資化し得る窒素源、例えば酵母エキス、マルトエキス（炭素源としても役立つ）等を、例えば0.1～5%の濃度で含有せしめることができる。さらに無機窒素源として、硝酸塩、アンモニウム塩等を例えば0.01%～2%の濃度で含有せしめることもできる。無機塩類として、リン酸塩、硫酸塩、塩化物等の陰イオンと、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン等の陽イオンとを添加することもできる。

【0048】液体培養は、通気、攪拌及び／又は振とう等の手段により好気的条件下で行う。培養温度は約20～35℃、好ましくは28℃～30℃である。本発明の第二の態様によれば、本発明のグルタミナーゼをコードするDNAを含んで成る発現プラスミドにより形質転換された宿主を培養する。宿主としては詳細に前記したものを使用し、常法に従って培養、好ましくは液体培養すればよい。

【0049】本発明の酵素は菌体外に分泌される。従って、固体培養した場合には、培養物を水又は水性緩衝液、例えばリン酸緩衝液等により抽出することにより酵素含有水溶液が得られる。また、液体培養した場合には、濾過、遠心分離等の常法に従って菌体を除去するこ

とにより、酵素含有液が得られる。酵素含有液から酵素を採取、精製するには、酵素の精製のための常法を用いればよい。例えば、塩析、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等を組合せて使用することができる。

【0050】

【実施例】次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

実施例1. アスペルギルス・ソヤーBA-104からのグルタミナーゼの製造

810gのふすまに810mlの50mMリン酸緩衝液（pH7.2）を加え、121℃、15分間オートクレーブをかけ、アスペルギルス・ソヤー（*Aspergillus sojae*）BA-104を植菌後、30℃、4日間培養した。培養後、8.2Lの水を加え、4℃で1晩抽出した。濾過後、1N NaOHでpH4.5に調整し、10mM酢酸ナトリウム塩酸緩衝液（pH4.5）で平衡化したDEAE-Sephacryl FF（アマシャムファルマシア社製）1Lを加え、濾過後、同緩衝液で洗浄を行い、0.15M NaClを加えた同緩衝液で溶出した。

【0051】その溶出液に40%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、40%飽和硫酸アンモニウムを加えた同緩衝液で平衡化したButyl Toyopearl 650M（30ψ×190mm、東ソー製）のカラムに供与し、40%から0%までの飽和硫酸アンモニウムのリニアグラジエントで溶出した。その活性画分を同緩衝液で透析した後、同緩衝液で平衡化したDEAE Toyopearl 650M（50ψ×870mm、東ソー製）のカラムに供与し、0Mから0.3MまでのNaClのリニアグラジエントで溶出した。

【0052】その活性画分をPEG20000で濃縮後、0.2M NaClを加えた50mMリン酸緩衝液（pH7）で平衡化したSephacryl S-300 HR（15ψ×840mm、アマシャムファルマシア社製）のカラムに供与し、その活性画分を得た。10mM酢酸ナトリウム塩酸緩衝液（pH4.5）で透析後、DEAE-8HR（5ψ×50mm、ウォーターズ社製）を用いたHPLCを使い、同緩衝液中で0Mから0.2MまでのNaClのリニアグラジエントで溶出した。その活性画分を40%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、Phenyl-5PW（7.5ψ×75mm、東ソー製）を用いたHPLCを使い、同緩衝液中で40%から0%までの飽和硫酸アンモニウムのリニアグラジエントで溶出した。この活性画分を蒸留水に対して透析後、精製酵素とした。全精製工程での活性の回収率1.73%、1180倍に精製した。精製の工程を次の表4に示す。

【0053】

【表4】

表4

精製段階	体積 (ml)	全蛋白質 (A ₂₈₀)	全活性 (ユニット)	比活性 (ユニット/A ₂₈₀)	収率 (%)
培養微生物	6570	119000	25.6	0.000215	100
DEAE-Sepharose FF	4350	20000	21.6	0.00108	84.4
Butyl-Toyopearl 650M	320	442	5.16	0.0117	20.2
DEAE-Toyopearl 650M	64.1	138	1.57	0.0114	6.13
Sephacryl S-300HR	30.0	77.4	1.44	0.0186	5.63
DEAE-8HR(HPLC)	9.0	12.0	0.942	0.0785	3.68
Phenyl-5PW(HPLC)	10.1	1.75	0.444	0.254	1.73

【0054】実施例2. アスペルギルス・オリゼーKBN616からのゲノムDNA及びcDNAのクローニング

(1) 部分アミノ酸配列の決定

実施例において精製した酵素100μg (0.1%SDS, 1mM EDTA, 0.125M Tris-HCl, pH6.8中)をLaemmliの方法を用いた15%ゲルSDS-PAGEに供与した。その上にV8プロテアーゼ(和光純薬社製)O.O

5μg (0.1% SDS, 1mM EDTA, 0.01% BPB, 10%グリセロール, 0.125M Tris-HCl, pH6.8中)を加え、室温、3時間泳動した。その後、PVDF膜にブロッキングし、N末端配列シーケンサー(パーキンエルマー社製ABI 476A)を用いて解析した。その結果、下記の部分アミノ酸配列が得られた。

【0055】

【化1】

N末端配列 Ala Ser Thr Phe Ser Pro Ala Arg Pro Pro Ala Leu (配列番号:5)
 33kDa(P1) Asn Gly Lys Tyr Pro Asn Thr Tyr Ala Met His Asp (配列番号:6)
 20kDa(P2) Xaa Gly Glu Xaa Tyr Xaa Ala Thr Asp Asp Gln (配列番号:7)
 10kDa(P3) Thr Tyr Gly Val Pro Leu Asp Thr Arg His Val Tyr
 Thr Lys Ala Asp Trp Glu Leu Phe Thr Ala Ala Ile
 Ala Ser Glu Ser Val Arg (配列番号:8)

【0056】(2) ゲノムDNAのクローニング

(a) プローブの調製

上記の部分配列P1及びP2に基づいて、下記のプライマーG1、G2及びG3を設計し、合成した。配列を下に

P2 Gly Glu Xaa Tyr Xaa Ala Thr

G1 ggt gaa tgt tat tgt gct ac

c g c c c c

P2 Tyr Xaa Ala Thr Asp Asp Gln

G2 tat tgt gct act gat gat ca

c c c c c c

P1

G3 tgc ata gca taa gta tta gg

g g g g g g

(配列番号:11)

Pro Asn Thr Tyr Ala Met His

cct aat act tat gct atg ca の相補

c c c c c c

(配列番号:12)

【0058】(b) ゲノムのDNAのクローニング及び全配列の決定

前記の合成DNAプライマーG1とG3を使用し、Raederらの方法(U. Raeder and P. Broda, Lett. Appl. Microb., 1, 17-20 (1985))により作製したアスペルギルス・オリゼーKBN616株の染色体DNAを鋳

型としてPCRで増幅を行った。その後、増幅できたDNA断片をG2とG3をプライマーとして再度PCRし、増幅してきた9bp短い702bpのDNA断片(GTF1)を得、そのDNA断片をpUC118にサブクローニング後、その配列を決定した。上記GTF1の塩基配列に基づいて、次の配列を有するDNAプライマーを設

計し、合成した。

【0059】

5'側用S1	accgtgaggaggtgattgtcaggtagtc	(配列番号:13)
5'側用S2	gagaataacgtgccagcagacgtcttcacc	(配列番号:14)
3'側用S1	tgccatacagtagcgaagggaacctaagg	(配列番号:15)
3'側用S2	aggactacgtgacaatcacctccctcacggt	(配列番号:16)

【化3】

【0060】前記のごとく調製したアスペルギルス・オリゼーKBN616のゲノムDNAの制限酵素(Sal I)分解物を鋳型とし、5'側用S1プライマー、5'側用S2プライマーとSal I Cassette, Cassette Primer C1, Cassette Primer C2(宝酒造製)を用いて、LA-PCR in vitro Cloning kit のプロトコールに従って5'方向にPCRで伸長増幅した。そして、得られたDNA断片(GTF2)についてその配列を決定した。

【0061】また、アスペルギルス・オリゼーKBN616のゲノムDNAのPst I分解物を鋳型とし、3'側用S1プライマー、3'側用S2プライマーとPst I Cassette, Cassette Primer C1, Cassette Primer C2(宝酒造製)を用いて、LA-PCR in vitro Cloning kit のプロトコールに従って3'方向にPCRで伸長増幅した。そして、得られたDNA断片(GTF3)についてその配列を決定した。決定した配列GTF1, GTF2, GTF3を統合し、配列番号:1に記載する全ゲノムDNA配列を決定した。

【0062】(c)発現用形質転換体の調製

配列番号:1に示す塩基番号884から3989の下流にSal Iの切断点を導入しながらPCRで増幅するために、下記のプライマー:

G4 ATGATGCATTTCTCTCTCGTTCTGTCTGTCG (配列番号:17)

G5 GGCCTCGACTAGAGCGGTGTTTGAGTCCGT (配列番号:18)

を調製し、アスペルギルス・オリゼーKBN616のゲノムDNAを鋳型として用いてPCR増幅により、3.1kbpのEco T221-Sal IのDNA断片(gt mA)を得、その配列を確認した。

【0063】pTF100(N. Kitamoto, et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 85-92 (1998))をSal IとEco T221で切断してアスペルギルス・オリゼーTEF1- α 遺伝子プロモーター断片(0.76kbp)を取り出し、前記のgt mAと接続後、pND300(N. Kitamoto, T. Kimura, Y. Kito, K. Ohmiya, N. Tsukagoshi, Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1795-1797 (1995))のSal Iサイトに挿入し、発現用ベクターpTFGL200を作製した。Kitamotoらの方法(N. Kitamoto, T. Kimura, Y. Kito, K. Ohmiya, N. Tsukagoshi, Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1795-1797 (1995))に従いpTFGL200をAspergillus oryzae KB

N616-39(niaD⁻)株に形質転換し、形質転換株GL20を得た。

【0064】(d)アスペルギルス・オリゼーKBN616のグルタミナーゼをコードするcDNAのクローニング

前記形質転換株GL20をGP培地で30℃、3日間振とう培養、培養菌糸からライフテックオリエンタル社製TRIZOL試薬を用い、そのプロトコールに従って全RNAを抽出した。得られた全RNAから、宝酒造製3'-FULL RACE Core SetとEx-RTaqを使用し、上流プライマーにG4を使用し、RT-PCRを行い、cDNAを得た。このcDNAの塩基配列を決定し、これと配列番号:1に記載する全ゲノムDNA配列を比較することにより、イントロンを決定した。その結果から配列番号:1及び配列番号:2のアミノ酸配列を決定した。

【0065】実施例3. アスペルギルス・オリゼーのグルタミナーゼの発現

前記形質転換株GL20を用いてGP培地(N. Kitamoto, et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 85-92 (1998))100mlを用い、30℃、10日間静置培養を行ったところ、9.4ユニット/lのグルタミナーゼ活性を得た。また、同じ培養液をLaemmliの方法に基づくSDS-PAGEを行ったところ、精製したグルタミナーゼと同様の位置にバンドが存在し、同様のグルタミナーゼの発現が確認できた。また、発現した蛋白質のN末端アミノ酸配列はAlaSerThrPheSerProAlaArgProProAlaLeuであり、精製グルタミナーゼと同じであった。

【0066】実施例4. アスペルギルス・ソヤーBA-104からの全ゲノムDNA配列及びcDNA配列の決定

(1)ゲノムDNAのクローニング

アスペルギルス・ソヤーBA-104株から、Raederらの方法(U. Raeder et. al., Lett. Appl. Microb., Vol. 1, p.17-20 (1985))により染色体DNAを調整し、これを鋳型としてPCR増幅を行った。その場合のプライマーは前記実施例2(2)(c)記載のG5(配列番号:18)と下記のG6を使用し行った。

G6 ATTGATCCGGATATAAGATGTCGTGTGATG (配列番号:19)

得られた3.9kbp DNA断片の全DNA配列を決定

し、配列番号：3に記載する全ゲノムDNA配列とした。

【0067】(2) 発現用形質転換体の調整

配列番号：3に示す塩基番号729から3854の下流にSallの切断点を導入しながらPCRで増幅するために、前記実施例2(2)(c)記載のG5(配列番号：18)と下記のプライマー：

G7 ATGATGCATTTCTCTCGTTTT
GTCTGTCG(配列番号：20)

を調整し、前記のアスペルギルス・ソヤーBA-104のゲノムDNAを鋳型として用いてPCR増幅により、3.1kbpのEcoT22I-SallのDNA断片を得た。

【0068】このDNA断片を前記実施例2(2)

(c)記載の方法と全く同じ方法でアスペルギルス・ソヤーBA-104のグルタミナーゼの発現用ベクターpTFGL201を構築し、Kitamotoらの方法(N. Kitamoto, Y. Kito, K. Ohmiya, N. Tsukagoshi., Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1795-1797 (1995))に従い、pTFGL201をアスペルギルス・オリゼーKBN616-39(niaD-)株に形質転換し、形質転換株22-30を得た。

【0069】(3) アスペルギルス・ソヤーBA-104のグルタミナーゼをコードするcDNAクローニング
前記形質転換株22-30をGP培地で30℃、3日間

振とう培養、培養菌系からライフテックオリエンタル社製TRIZOL試薬を用い、そのプロトコールに従って、全DNAを抽出した。得られた全RNAから、宝酒造製3' Full RACE Core SetとEx-Taqを使用し、上流プライマーにG7を使用し、RT-PCRを行い、cDNAを得た。このcDNAの塩基配列を決定し、これと配列番号：3に記載する全ゲノムDNA配列を比較することにより、イントロンを決定した。その結果から配列番号：3及び配列番号：4のアミノ酸配列を決定した。

【0070】実施例5. アスペルギルス・ソヤーBA-104のグルタミナーゼ発現

22-30株を用いてGP培地(N. Kitamoto, et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 85-92 (1998)) 100mlを用い、30℃、9日間静置培養を行ったところ、7.3ユニット/lのグルタミナーゼ活性を得た。また、同じ培養液をLaemmliの方法に基づくSDS-PAGEを行ったところ、精製したグルタミナーゼと同様の位置にバンドが存在し、同様のグルタミナーゼの発現が確認できた。また、発現した蛋白質のN末端アミノ酸配列はAla-Ser-Thr-Phe-Ser-Pro-Ala-Arg-Pro-Pro-Ala-Leuであり、精製グルタミナーゼと同じであった。

【0071】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>
<120> Novel glutaminase and process for puroduction there of
<160>
<210> 1
<211> 3431
<212> DNA
<213> Aspergillus oryzae KBN616
<220>
<221> CDS
<222> (894) ... (1080)、(1096) ... (1451)、(1510) ... (1954)、(2009) ... (2596)、(2647) ... (2847)、(2594) ... (3037)、(3093) ... (3228)、(3275) ... (3341)
<221> intron
<222> (1081) ... (1095)、(1452) ... (1509)、(1955) ... (2008)、(2597) ... (2646)、(2848) ... (2893)、(3038) ... (3092)、(3229) ... (3274)
<223> Genomic DNA coding for glutaminase derived from Aspergillus oryzae KBN616
<400> 1
gtcgacacat ctgcgacgog aatcgcccc gtgcaccccc tcccagttga tgcagtagct 60
cggctaccgg aagagattta ttcttagtcc cttgttgga ttgggattca ccctcgcttc 120
tgtttctcac cgtatttata tcgcgcaatg agattgatcc ggatataaga tgtctgtgat 180
gcactctttc tcacgcaccg aggtaataca tatcatatgc ttcccccctca tatcactgcc 240

gaaaagacta actcgggtcta ccccatagtc accagccact agcgtttctt gggcctctcc 300
 ttgtttgctc aggtggatct aaagccaaga ctatcatggt ttagtgctgg gttgtcttca 360
 ttagatcgtc tgcagcccca gagtgtatcg gcttaggact ggctgagccc gacgcggcta 420
 aggataaggt acatactccc actctatcga cccttgcttg ttaatctccg atcttgcttc 480
 ctgtccaatt gtcgggcttc tcttgaatt ccaggtttct ttcacctgtc gggcagccgg 540
 atcgaggccg catgaattgc tccccacag agactgacag gtcaggcgat attgggggag 600
 tcacaatcat gcgcgcccc attccgcatt ccgtttctcg accctcatgc agcgtgctaa 660
 acttccatag tccctcctga attgtctgcc ctgccctccg gtatcggggc tggaccaact 720
 atataagtgt gcctaacatt ccttcagcat tcttcaggcc cacattctcg ggggcacgtt 780
 ttttggcgga tctcgatcct actctttcat tctttgaaga aacctggaat tattacgtgt 840
 ataa atg aag gat gta ccc tgt gtg aat ccc tca ata cgg atc atg atg 889
 Met Lys Asp Val Pro Cys Val Asn Pro Ser Ile Arg Ile Met Met
 5 10 15
 cat ttc ctc tcg ttc tgt ctg tcg gtg gcc tcc ctg gtg tct tac gcc 937
 His Phe Leu Ser Phe Cys Leu Ser Val Ala Ser Leu Val Ser Tyr Ala
 20 25 30
 gga gct gcg tca aca ttc tcc cct gcg agg cca ccc gcc ctg ccc ttg 985
 Gly Ala Ala Ser Thr Phe Ser Pro Ala Arg Pro Pro Ala Leu Pro Leu
 35 40 45
 gct gtc aaa tcg ccg tac ttg agc aca tgg ctc tct gcg ggc aca gat 1033
 Ala Val Lys Ser Pro Tyr Leu Ser Thr Trp Leu Ser Ala Gly Thr Asp
 50 55 60
 ggc ggt aat gga ggg tac ctg gcc ggc caa tgg cct acc ttc tgg tt 1080
 Gly Gly Asn Gly Gly Tyr Leu Ala Gly Gln Trp Pro Thr Phe Trp Ph
 65 70 75
 gtgagtagtc ccgagctgta gaaatgaaga catccatctt gatgtacatt ggctaaacca 1189
 cgtccctcgt ggcag c ggc cag gtg acc ggc tgg gcg ggt cag atc cgg
 e Gly Gln Val Thr Gly Trp Ala Gly Gln Ile Arg
 80 85 90
 gtc gat aat tog acc tac aca tgg atg ggg gcg atc cct aac acc cct 1237
 Val Asp Asn Ser Thr Tyr Thr Trp Met Gly Ala Ile Pro Asn Thr Pro
 95 100 105
 acg gtg aac cag aca tcc ttc gag tac acc tcg acg tcg agc gtg ttc 1285
 Thr Val Asn Gln Thr Ser Phe Glu Tyr Thr Ser Thr Ser Ser Val Phe
 110 115 120
 acg atg cgt gtt ggg gat atg gtg gaa atg aaa gtg aaa ttc ctg tcc 1333
 Thr Met Arg Val Gly Asp Met Val Glu Met Lys Val Lys Phe Leu Ser
 125 130 135
 cct atc aca cca gat gat ctc cgg aga cag tcg ctt gtg ttt tcc tat 1381
 Pro Ile Thr Pro Asp Asp Leu Arg Arg Gln Ser Leu Val Phe Ser Tyr
 140 145 150
 ctg gac gta gat gtc gaa tcg atc gac ggc aaa gcg cat gac ata cag 1429
 Leu Asp Val Asp Val Glu Ser Ile Asp Gly Lys Ala His Asp Ile Gln
 155 160 165 170
 gtg tac gca gac att tca gca g gtaagcaaga cgacaacca cctggaacag 1481
 Val Tyr Ala Asp Ile Ser Ala G
 175
 tgccaatata catctaaccg ggtcttag aa tgg gcg tcc ggg gac cga aac 1534
 lu Trp Ala Ser Gly Asp Arg Asn
 180 185

```

gcc att gcg cag tgg gac tat ggt gtc aca gat gat ggc gtt gcc tat 1582
Ala Ile Ala Gln Trp Asp Tyr Gly Val Thr Asp Asp Gly Val Ala Tyr
190 195 200
cac aag gtt tac cgc caa acg cag ctg ctg ttt tcc gaa aac act gag 1630
His Lys Val Tyr Arg Gln Thr Gln Leu Leu Phe Ser Glu Asn Thr Glu
205 210 215
cag gcc gaa tgg ggc gag tgg tac tgg gcc aca gac gac caa gat ggt 1678
Glu Ala Glu Trp Gly Glu Trp Tyr Trp Ala Thr Asp Asp Gln Asp Gly
220 225 230
ctg agc tac cag tcc gga ccg gat gtt gat gtg cga ggg gca ttc gca 1726
Leu Ser Tyr Gln Ser Gly Pro Asp Val Asp Val Arg Gly Ala Phe Ala
235 240 245
aag aac gga aag ttg gcg aat tcg gat gat aaa aat tat cgt gca atc 1774
Lys Asn Gly Lys Leu Ala Asn Ser Asp Asp Lys Asn Tyr Arg Ala Ile
250 255 260 265
tcg acc aat tgg ccc gtg ttt gcc ttc tcc cgc gat ctt ggc tcg gtg 1822
Ser Thr Asn Trp Pro Val Phe Ala Phe Ser Arg Asp Leu Gly Ser Val
270 275 280
aag acg tct gct ggc acg tta ttc tcc att ggc ctt gcg cag gac agt 1870
Lys Thr Ser Ala Gly Thr Leu Phe Ser Ile Gly Leu ala Gln Asp Ser
285 290 295
gcc ata cag tac agt ggg aaa cct gaa ggg aca act gtg atg cct tca 1918
Ala Ile Gln Tyr Ser Gly Lys Pro Glu Gly Thr Thr Val Met Pro Ser
300 305 310
ctc tgg aag agc tac ttc agc act gcg act gct gcg gtaagtggcc 1964
Leu Trp Lys Ser Tyr Phe Ser Thr Ala Thr Ala Ala
315 320 325
cactgctgtt tcggacctag aacataatct gaccatctat gtag ctt gag ttc ttc 2020
Leu Glu Phe Phe
cat cat gat tat gct gct gca gct gca cta tcg aag gat ctc gat gac 2068
His His Asp Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Lys Asp Leu Asp Asp
330 335 340 345
cgg ata tcc aag gat tcc att gat gcc gct ggc cag gac tac ctg aca 2116
Arg Ile Ser Lys Asp Ser Ile Asp Ala Ala Gly Gln Asp Tyr Leu Thr
350 355 360
atc acc tcc ctc acg gtc cgt caa gtc ttt gct gcc gtg caa ttg acc 2164
Ile Thr Ser Leu Thr Val Arg Gln Val Phe Ala Ala Val Gln Leu Thr
365 370 375
ggc acg ccc gag gac ccc tac atc ttc atg aag gag atc tcg tcc aat 2212
Gly Thr Pro Glu Asp Pro Tyr Ile Phe Met Lys Glu Ile Ser Ser Asn
380 385 390
ggc aac atg aac act gtg gac gtc atc ttc ccc gct cac ccg atc ttt 2260
Gly Asn Met Asn Thr Val Asp Val Ile Phe Pro Ala His Pro Ile Phe
395 400 405
ttg tac acc aat ccc gag ctc ctc aaa ctg att ctg aag cca atc tat 2308
Leu Tyr Thr Asn Pro Glu Leu Leu Lys Leu Ile Leu Lys Pro Ile Tyr
410 415 420 425
gag att caa gag aac gga aag tat ccc aac aca tac gcc atg cac gat 2356
Glu Ile Gln Glu Asn Gly Lys Tyr Pro Asn Thr Tyr Ala Met His Asp
430 435 440

```

att gga acc cac tac ccg aac gcc acg ggc cat cct aag ggc gac gac 2404
 Ile Gly Thr His Tyr Pro Asn Ala Thr Gly His Pro Lys Gly Asp Asp
 445 450 455
 gag aaa atg cca ctc gag gag tgt gga aac atg gtt atc atg gcc ctt 2452
 Glu Lys Met Pro Leu Glu Glu Cys Gly Asn Met Val Ile Met Ala Leu
 460 465 470
 gcc tac gcc cag aag gcc aag gac aac gac tat ctt tca cag cac tat 2500
 Ala Tyr Ala Gln Lys Ala Lys Asp Asn Asp Tyr Leu Ser Gln His Tyr
 475 480 485
 ccc atc ctc aac aaa tgg aca aca tac ctc gtc gag gat tct att tac 2548
 Pro Ile Leu Asn Lys Trp Thr Thr Tyr Leu Val Glu Asp Ser Ile Tyr
 490 495 500 505
 ccg gcg aac cag atc tct acg gat gac ttt gct ggc tgc cta gc 2596
 Pro Ala Asn Gln Ile Ser Thr Asp Asp Phe Ala Gly Ser Leu Al
 510 515
 gtaagtata tacatacacg acacaggcgg tgataactaat agtatgtacag a aac 2650
 a Asn
 cag acc aac ctg gca ttg aag gga atc att gga atc cag gca atg gct 2698
 Gln Thr Asn Leu Ala Leu Lys Gly Ile Ile Gly Ile Gln Ala Met Ala
 525 530 535
 gtg atc agc aat acg aca gga cac ccg gac gat gcc tcc aac cac tcc 2746
 Val Ile Ser Asn Thr Thr Gly His Pro Asp Asp Ala Ser Asn His Ser
 540 545 550
 agc att gcc aag gac tac atc gcg agg tgg cag aca cta ggc gta gct 2794
 Ser Ile Ala Lys Asp Tyr Ile Ala Arg Trp Gln Thr Leu Gly Val Ala
 555 560 565
 cac gat gcc aat cct ccg cat aca acg ctg tgc tac gga gcg aac gag 2840
 His Asp Ala Asn Pro Pro His Thr Thr Leu Ser Tyr Gly Ala Asn Glu
 570 575 580 585
 act cat g gtcagttagc cgtccgggt gcacttataa tactgacttt ctccag gg 2895
 Thr His G ly
 ctt ctg tac aat ctg tat gcg gat cgt gaa ttg ggc ttg aac ttg gtt 2943
 Leu Leu Tyr Asn Leu Tyr Ala Asp Arg Glu Leu Gly Leu Asn Leu Val
 590 595 600
 cct cag tgc gtc tat gac atg caa aac acc ttc tat ccg acg gtg aag 2991
 Pro Gln Ser Val Tyr Asp Met Gln Asn Thr Phe Tyr Pro Thr Val Lys
 605 610 615 620
 gag aag tat gga gtg ccg ctc gat act cga cac gtg tac act aag g 3037
 Glu Lys Tyr Gly Val Pro Leu Asp Thr Arg His Val Tyr Thr Lys A
 625 630 635
 gtaagctcga tatgttcttt ctaatgtttg acattgaata ttgacttgtc ccag cg 3094
 la
 gat tgg gag ctt ttc aca gct gcg gtt gcg tgc gag agt gtc cga gac 3142
 Asp Trp Glu Leu Phe Thr Ala Ala Val Ala Ser Glu Ser Val Arg Asp
 640 645 650
 atg ttc cac cag gcg ctc gcg acg tgg atc aac gag aca ccg acc aac 3190
 Met Phe His Gln Ala Leu Ala Thr Trp Ile Asn Glu Thr Pro Thr Asn
 655 660 665
 cgt gcc ttt acg gat ctc tat gat acc caa act gga aa gtaagtgttt 3238

Arg Ala Phe Thr Asp Leu Tyr Asp Thr Gln Thr Gly As
 670 675 680
 gccaaagggc tgcttgggcc ttgctgacca atatat t tat ccg gcg ggc att 3290
 n Tyr Pro Ala Gly Ile
 685
 acg ttc att gcg cgg ccc gtc atg ggt ggt gcc ttt gcg ttg tta att 3338
 Thr Phe Ile Ala Arg Pro Val Met Gly Gly Ala Phe Ala Leu Ile
 690 695 700
 ctc tag agtcgtttca ttgtatattg attttattcg cttctgggcg cgagtggaga 3394
 Leu
 cacttgctta ctttgtttcc aattttatta ttaccgtggc tatgggacca gattgaccgt 3454
 tgtaaatagc gtacctcata catagcattt ttattctgca aatagtgttg ttgtatttgg 3514
 gtctccaata ataatgcgtt cgtagacgat gctccaaagg aactatctgg tctgcaagct 3574
 gcttatatca agcatatata aagatctacg tatccagtcg tgcttatcca agtggctctg 3634
 gccatctacc gcagatcgta agtggactcg accgagccat cccacgcacg aaaagcgcga 3694
 ataagatcta caaagtcagc aatcatactc ctcgcaacct ttgataaagc agagaaagag 3754
 aggaaaaaga acataccata atacaaagcc atcgccctcca aatgcacatc aaccgcgacc 3814
 ctctcatcaa ccgtatgaat attcaacgcc cccccagccc ttgacggact ccaccgataa 3874
 atattcctcg acaaattcca ataaaacctc gtgtcagtat tcccgcgtat gatatcccca 3934
 ctcaccacca ccgtcttgcc ctccaactg ggcacggact caaacaccgc tctagcgacg 3994
 ccggcaaaacc gcgtccaaac cgcacotcgc cccgtccccc tgggactcac cggcgccggc 4054
 gacacgatcc gctcaacgic gagatcgtca aatggttcac cttcccttcc tctctcttct 4114
 tgttctccgg gaacgcagct aacgtgagat taaacttctc cacaatgggc gacacaatcc 4174
 gcacagcccg atccatgact tcttccgggg tttggtgcaa cgcaaccggg tagttcacga 4234
 tcgcttcgat atgttccggg agtgcgttcg tcttgacccc gccgtggaag agatcggctg 4294
 cttgcgaggt ctgcag 4310

【0072】

<210> 2

<211> 703

<212> PRT

<213> *Aspergillus oryzae* KBN616<214> Amino acid sequence of glutaminase of *Aspergillus oryzae* KBN616

<402> 2

Met Lys Asp Val Pro Cys Val Asn Pro Ser Ile Arg Ile Met Met His
 5 10 15
 Phe Leu Ser Phe Cys Leu Ser Val Ala Ser Leu Val Ser Tyr Ala Gly
 20 25 30
 Ala Ala Ser Thr Phe Ser Pro Ala Arg Pro Pro Ala Leu Pro Leu Ala
 35 40 45
 Val Lys Ser Pro Tyr Leu Ser Thr Trp Leu Ser Ala Gly Thr Asp Gly
 50 55 60
 Gly Asn Gly Gly Tyr Leu Ala Gly Gln Trp Pro Thr Phe Trp Phe Gly
 65 70 75 80
 Gln Val Thr Gly Trp Ala Gly Gln Ile Arg Val Asp Asn Ser Thr Tyr
 85 90 95
 Thr Trp Met Gly Ala Ile Pro Asn Thr Pro Thr Val Asn Gln Thr Ser
 100 105 110

Phe Glu Tyr Thr Ser Thr Ser Ser Val Phe Thr Met Arg Val Gly Asp

115	120	125
Met Val Glu Met Lys Val Lys Phe Leu Ser Pro Ile Thr Pro Asp Asp		
130	135	140
Leu Arg Arg Gln Ser Leu Val Phe Ser Tyr Leu Asp Val Asp Val Glu		
145	150	155
Ser Ile Asp Gly Lys Ala His Asp Ile Gln Val Tyr Ala Asp Ile Ser		
165	170	175
Ala Glu Trp Ala Ser Gly Asp Arg Asn Ala Ile Ala Gln Trp Asp Tyr		
180	185	190
Gly Val Thr Asp Asp Gly Val Ala Tyr His Lys Val Tyr Arg Gln Thr		
195	200	205
Gln Leu Leu Phe Ser Glu Asn Thr Glu Glu Ala Glu Trp Gly Glu Trp		
210	215	220
Tyr Trp Ala Thr Asp Asp Gln Asp Gly Leu Ser Tyr Gln Ser Gly Pro		
225	230	235
Asp Val Asp Val Arg Gly Ala Phe Ala Lys Asn Gly Lys Leu Ala Asn		
245	250	255
Ser Asp Asp Lys Asn Tyr Arg Ala Ile Ser Thr Asn Trp Pro Val Phe		
260	265	270
Ala Phe Ser Arg Asp Leu Gly Ser Val Lys Thr Ser Ala Gly Thr Leu		
275	280	285
Phe Ser Ile Gly Leu Ala Gln Asp Ser Ala Ile Gln Tyr Ser Gly Lys		
290	295	300
Pro Glu Gly Thr Thr Val Met Pro Ser Leu Trp Lys Ser Tyr Phe Ser		
305	310	315
Thr Ala Thr Ala Ala Leu Glu Phe Phe His His Asp Tyr Ala Ala Ala		
325	330	335
Ala Ala Leu Ser Lys Asp Leu Asp Asp Arg Ile Ser Lys Asp Ser Ile		
340	345	350
Asp Ala Ala Gly Gln Asp Tyr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Thr Val Arg		
355	360	365
Gln Val Phe Ala Ala Val Gln Leu Thr Gly Thr Pro Glu Asp Pro Tyr		
370	375	380
Ile Phe Met Lys Glu Ile Ser Ser Asn Gly Asn Met Asn Thr Val Asp		
385	390	395
Val Ile Phe Pro Ala His Pro Ile Phe Leu Tyr Thr Asn Pro Glu Leu		
405	410	415
Leu Lys Leu Ile Leu Lys Pro Ile Tyr Glu Ile Gln Glu Asn Gly Lys		
420	425	430
Tyr Pro Asn Thr Tyr Ala Met His Asp Ile Gly Thr His Tyr Pro Asn		
435	440	445
Ala Thr Gly His Pro Lys Gly Asp Asp Glu Lys Met Pro Leu Glu Glu		
450	455	460
Cys Gly Asn Met Val Ile Met Ala Leu Ala Tyr Ala Gln Lys Ala Lys		
465	470	475
Asp Asn Asp Tyr Leu Ser Gln His Tyr Pro Ile Leu Asn Lys Trp Thr		
485	490	495
Thr Tyr Leu Val Glu Asp Ser Ile Tyr Pro Ala Asn Gln Ile Ser Thr		
500	505	510

Asp Asp Phe Ala Gly Ser Leu Ala Asn Gln Thr Asn Leu Ala Leu Lys
 515 520 525
 Gly Ile Ile Gly Ile Gln Ala Met Ala Val Ile Ser Asn Thr Thr Gly
 530 535 540
 His Pro Asp Asp Ala Ser Asn His Ser Ser Ile Ala Lys Asp Tyr Ile
 545 550 555 560

 Ala Arg Trp Gln Thr Leu Gly Val Ala His Asp Ala Asn Pro Pro His
 565 570 575
 Thr Thr Leu Ser Tyr Gly Ala Asn Glu Thr His Gly Leu Leu Tyr Asn
 580 585 590
 Leu Tyr Ala Asp Arg Glu Leu Gly Leu Asn Leu Val Pro Gln Ser Val
 595 600 605
 Tyr Asp Met Gln Asn Thr Phe Tyr Pro Thr Val Lys Glu Lys Tyr Gly
 610 615 620
 Val Pro Leu Asp Thr Arg His Val Tyr Thr Lys Ala Asp Trp Glu Leu
 625 630 635 640
 Phe Thr Ala Ala Val Ala Ser Glu Ser Val Arg Asp Met Phe His Gln
 645 650 655
 Ala Leu Ala Thr Trp Ile Asn Glu Thr Pro Thr Asn Arg Ala Phe Thr
 660 665 670
 Asp Leu Tyr Asp Thr Gln Thr Gly Asn Tyr Pro Ala Gly Ile Thr Phe
 675 680 685
 Ile Ala Arg Pro Val Met Gly Gly Ala Phe Ala Leu Leu Ile Leu
 690 695 700

[0073]

(210) 3
 (211) 3854
 (212) DNA
 (213) *Aspergillus sojae* BA-104
 (220)
 (221) CDS
 (222) (690) ... (925)、(1001) ... (1296)、(1355)
) ... (1797)、(1852) ... (2435)、(2486) ... (2685)
 、(2735) ... (2879)、(2935) ... (3070)、(3117) ...
 (3183)
 (221) intron
 (222) (925) ... (1000)、(1297) ... (1354)、(179
 8) ... (1851)、(2436) ... (2485)、(2686) ... (2734
)、(2880) ... (2934)、(3071) ... (3116)
 (223) Genomic DNA coding for glutaminase derived from *Aspergillus so*
jae BA-104
 (400) 3

gatccggata taagatgtct gtgatgtct ctttctcgcg caccgaggta atcaatgtca 60
 tatgctttcc cctcatatca ctgccgaaaa gactaactcg gtctacccca tagtcaccag 120
 ccactagcgc ttcttgggcc tctccttgtt tgctcagggtg gatctaaagc caagactatc 180
 atggtttagt gtccggttgt cttcattaga tcgcctgcag ccccagagta tatcggccta 240
 ggactggtcg agcccgagc ggctaaggat aaggtagata ctcccagtcg gtcgaccctt 300
 gcttgttaat ctccgatctt gtctcctgtc caattgtcgg gcttctcctg gaattccgtg 360
 tttctttcac ctgtcgggca ggcggatcga ggccgcatga attgcttccc cacagagact 420

```

ggcagggtcag gcgatattgg gggagtcaca atcatgcgcg cccccattcc gcattccgtt 480
tctagaccct catgcagcgt gctaaacttc catagtccct cctgaattgt ctaccctgcc 540
ctccggtatg cgggctggac caactatata agtgtgccta acattccttc agcattcttc 600
aggccacat tctcgtggc acgtttttcg gcggatttcg atcctactct ttcattcttt 660
gaagaaatct ggaattatta cgtgtataa atg aag gat gta ccc tgt gtg aat 713
                               Met Lys Asp Val Pro Cys Val Asn
                               5
ccc tca ata cgg atc atg 731
Pro Ser Ile Arg Ile Met
    10
atg cat ttc ctc tcg ttt tgt ctg tcg gtg gcc tcc ctg gtc tct tac 779
Met His Phe Leu Ser Phe Cys Leu Ser Val Ala Ser Leu Val Ser Tyr
    15                20                25                30
gcg gga gct gcg tca acc ttc tcc cct gcg agg cca ccc gcc ctg ccc 827
Ala Gly Ala Ala Ser Thr Phe Ser Pro Ala Arg Pro Pro Ala Leu Pro
                35                40                45
ttg gct gtc aag tcg ccg tac ttg agc aca tgg ctc tct gcg ggc acg 875
Leu Ala Val Lys Ser Pro Tyr Leu Ser Thr Trp Leu Ser Ala Gly Thr
                50                55                60
gat ggc ggt aat gga ggg tac ctg gcc ggc caa tgg cct acc ttc tgg 923
Asp Gly Gly Asn Gly Gly Tyr Leu Ala Gly Gln Trp Pro Thr Phe Trp
                65                70                75
tt gtgagtagtc ccgtgctgta gaaatgaaga catccaactt ggtgtacatt 975
Ph
ggctaaacca cgttcctggt ggtag c ggc cag gtg acc ggc tgg gct ggt cag 1028
                               e Gly Gln Val Thr Gly Trp Ala Gly Gln
                               80                85
atc cgg gtc gat aat tcg acc tac aca tgg atg ggg gcg atc cct aac 1076
Ile Arg Val Asp Asn Ser Thr Tyr Thr Trp Met Gly Ala Ile Pro Asn
    90                95                100
acc cct acg gtg aac cag aca tcc ttc gag tac acc tcg acg tcg agc 1124
Thr Pro Thr Val Asn Gln Thr Ser Phe Glu Tyr Thr Ser Thr Ser Ser
    105                110                115                120
gtg ttc acg atg cgt gtt ggg gat atg gtg gaa atg aaa gtg aaa ttc 1172
Val Phe Thr Met Arg Val Gly Asp Met Val Glu Met Lys Val Lys Phe
                125                130                135
ctt tcc cct atc aca cca gat gat ctc cgg aga cag tcg ctt gtg ttt 1220
Leu Ser Pro Ile Thr Pro Asp Asp Leu Arg Arg Gln Ser Leu Val Phe
                140                145                150
tcc tat ctg gac gta gat gtc gaa tcg atc gac ggc aaa gcg cat gac 1268
Ser Tyr Leu Asp Val Asp Val Glu Ser Ile Asp Gly Lys Ala His Asp
                155                160                165
ata cag gtg tac gca gac ata tca gca g gtaagcaaga tgacgaacca 1316
Ile Gln Val Tyr Ala Asp Ile Ser Ala G
    170                175
cctggaacag tgcgaatatc catctaaccg ggccttag ag tgg gtg tcc ggg gac 1371
                               lu Trp Val Ser Gly Asp
                               180
cga aat gcc att gcg cag tgg gac tat ggt gtc acg gat gat ggc gtc 1419
Arg Asn Ala Ile Ala Gln Trp Asp Tyr Gly Val Thr Asp Asp Gly Val

```

185	190	195	
gcc tat cac aag gtt tac cgc caa acg caa ctg ctg ttc tcc gag aac			1467
Ala Tyr His Lys Val Tyr Arg Gln Thr Gln Leu Leu Phe Ser Glu Asn			
200	205	210	215
act gaa cag gcc gaa tgg ggc gag tgg tac tgg gca aca gac gac caa			1515
Thr Glu Gln Ala Glu Trp Gly Glu Trp Tyr Trp Ala Thr Asp Asp Gln			
220	225	230	
gat ggt ctg acc tac cag tcc gga ccg gat gtt gat gtg cgc ggg gca			1563
Asp Gly Leu Thr Tyr Gln Ser Gly Pro Asp Val Asp Val Arg Gly Ala			
235	240	245	
ttc gca aag aac gga aag ttg gtg aat tct gat gat aaa aat tac cgt			1611
Phe Ala Lys Asn Gly Lys Leu Val Asn Ser Asp Asp Lys Asn Tyr Arg			
250	255	260	
gca atc tcg acc aat tgg cct gtg ttt gcc ttc tcc cgc gac ctt ggc			1659
Ala Ile Ser Thr Asn Trp Pro Val Phe Ala Phe Ser Arg Asp Leu Gly			
265	270	275	
acg gtg aag acg tct gct ggc acg tta ttc tcc att ggc ctt gcg cag			1707
Thr Val Lys Thr Ser Ala Gly Thr Leu Phe Ser Ile Gly Leu Ala Gln			
280	285	290	295
gac agt gcc att cag tac agt ggg aaa gct gaa gga aca acc gtg atg			1755
Asp Ser Ala Ile Gln Tyr Ser Gly Lys Ala Glu Gly Thr Thr Val Met			
300	305	310	
cct tca ctc tgg aag agc tat ttc agc act gcg act gct gcg			1797
Pro Ser Leu Trp Lys Ser Tyr Phe Ser Thr Ala Thr Ala Ala			
315	320	325	
gtgagtgatc cactgttatt tcggacctag aacataatct gacaatccat gtag ctt			1854
			Leu
gag ttc ttc cat cat gat tat gct gct gct gca gca cta tcg aag gat			1902
Glu Phe Phe His His Asp Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Lys Asp			
330	335	340	
ctc gat gac cgg ata tcc aag gat tcc att gat gcc gcc ggc cag gac			1950
Leu Asp Asp Arg Ile Ser Lys Asp Ser Ile Asp Ala Ala Gly Gln Asp			
345	350	355	
tac ttg aca atc acc tcc ctt acg gtt cgt caa gtc ttt gct gca gtg			1998
Tyr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Thr Val Arg Gln Val Phe Ala Ala Val			
360	365	370	
caa ttg acc ggg acg ccc gag gac ccc tac atc ttc atg aag gaa atc			2046
Gln Leu Thr Gly Thr Pro Glu Asp Pro Tyr Ile Phe Met Lys Glu Ile			
375	380	385	390
tcg tct aat ggc aac atg aac act gtg gac gtc atc ttc ccc gct cac			2094
Ser Ser Asn Gly Asn Met Asn Thr Val Asp Val Ile Phe Pro Ala His			
395	400	405	
ccg atc ttt ttg tac acc aat ccc gag ctc ctc aaa ctg att ctg aag			2142
Pro Ile Phe Leu Tyr Thr Asn Pro Glu Leu Leu Lys Leu Ile Leu Lys			
410	415	420	
cca atc ttt gag att caa gag aac gga aag tat ccc aac aca tac gcc			2190
Pro Ile Phe Glu Ile Gln Glu Asn Gly Lys Tyr Pro Asn Thr Tyr Ala			
425	430	435	
atg cac gat att gga acc cac tac ccg aat gcc acc ggt tat cct aag			2238
Met His Asp Ile Gly Thr His Tyr Pro Asn Ala Thr Gly Tyr Pro Lys			

440 445 450
 ggc gac gac gag aaa atg cca ctc gag gag tgt gga aac atg gtt atc 2286
 Gly Asp Asp Glu Lys Met Pro Leu Glu Glu Cys Gly Asn Met Val Ile
 455 460 465 470
 atg gcc ctt gcc tac gcc cag aag gct aag gac aac gac tat ctc tca 2334
 Met Ala Leu Ala Tyr Ala Gln Lys Ala Lys Asp Asn Asp Tyr Leu Ser
 475 480 485
 cag cac tat ccc atc ctc gaa aaa tgg aca aca tac ctc gtg gag gat 2382
 Gln His Tyr Pro Ile Leu Glu Lys Trp Thr Thr Tyr Leu Val Glu Asp
 490 495 500
 tct att tac ccg gcg aac cag atc tct acg gat gac ttt gct gcc tcg 2430
 Ser Ile Tyr Pro Ala Asn Gln Ile Ser Thr Asp Asp Phe Ala Gly Ser
 505 510 515
 cta gc gtaagtata tacatgcacg agacaggcgt tgatactaata agtatgtacag a 2486
 Leu Al a
 aac cag acc aac ctg gca tta aag gga atc att gga atc cag gca atg 2534
 Asn Gln Thr Asn Leu Ala Leu Lys Gly Ile Ile Gly Ile Gln Ala Met
 525 530 535
 gct gtg atc agc aat acg aca gga cac ccg gac gat gcg tct aac cac 2582
 Ala Val Ile Ser Asn Thr Thr Gly His Pro Asp Asp Ala Ser Asn His
 540 545 550
 tcc agc att gcc aag gac tac atc gcg agg tgg cag aca cta gcc gta 2630
 Ser Ser Ile Ala Lys Asp Tyr Ile Ala Arg Trp Gln Thr Leu Gly Val
 555 560 565
 gct cac gat gcc aat cct ccg cat acg aca ctg tcg tac gga gcg aac 2678
 Ala His Asp Ala Asn Pro Pro His Thr Thr Leu Ser Tyr Gly Ala Asn
 570 575 580
 gag act cat g gtcagttggc cgctccgggt acacttatag tactgacttt ctccag 2734
 Glu Thr His G
 585
 gg ctt ctg tac aat ctg tac gcg gat cgt gaa ttg ggc ttg aac ttg 2782
 ly Leu Leu Tyr Asn Leu Tyr Ala Asp Arg Glu Leu Gly Leu Asn Leu
 590 595 600
 gtt cct cag tca gtc tat gac atg caa aac acc ttt tat ccg acg gtg 2830
 Val Pro Gln Ser Val Tyr Asp Met Gln Asn Thr Phe Tyr Pro Thr Val
 605 610 615
 aag gag acg tat gga gtg ccg ctt gat act cga cat gtg tac act aag 2878
 Lys Glu Thr Tyr Gly Val Pro Leu Asp Thr Arg His Val Tyr Thr Lys
 620 625 630 635
 g gtaagticaa tatgttcttt ctgatgtttg aaattgaata ttgactggtc cccag cg 2936
 A la
 gat tgg gag ctt ttc aca gcc gcg att gcg tcg gag agc gtc cga gac 2984
 Asp Trp Glu Leu Phe Thr Ala Ala Ile Ala Ser Glu Ser Val Arg Asp
 640 645 650
 atg ttc cac aag gcg ctt gcg acg tgg atc aac gag acc ccg acc aac 3032
 Met Phe His Lys Ala Leu Ala Thr Trp Ile Asn Glu Thr Pro Thr Asn
 655 660 665
 cgt gcc ttt acg gat ctc tat gat acc caa act gga aa gtaagtgttt 3080
 Arg Ala Phe Thr Asp Leu Tyr Asp Thr Gln Thr Gly As
 670 675 680

【0074】

Met	Lys	Asp	Val	Pro	Cys	Val	Asn	Pro	Ser	Ile	Arg	Ile	Met	Met	His
				5				10				15			
Phe	Leu	Ser	Phe	Cys	Leu	Ser	Val	Ala	Ser	Leu	Val	Ser	Tyr	Ala	Gly
				20				25				30			
Ala	Ala	Ser	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Arg	Pro	Pro	Ala	Leu	Pro	Leu	Ala
				35				40				45			
Val	Lys	Ser	Pro	Tyr	Leu	Ser	Thr	Trp	Leu	Ser	Ala	Gly	Thr	Asp	Gly
				50				55				60			
Gly	Asn	Gly	Gly	Tyr	Leu	Ala	Gly	Gln	Trp	Pro	Thr	Phe	Trp	Phe	Gly
				65				70				75			
Gln	Val	Thr	Gly	Trp	Ala	Gly	Gln	Ile	Arg	Val	Asp	Asn	Ser	Thr	Tyr
				85				90				95			
Thr	Trp	Met	Gly	Ala	Ile	Pro	Asn	Thr	Pro	Thr	Val	Asn	Gln	Thr	Ser
				100				105				110			
Phe	Glu	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ser	Ser	Val	Phe	Thr	Met	Arg	Val	Gly	Asp
				115				120				125			
Met	Val	Glu	Met	Lys	Val	Lys	Phe	Leu	Ser	Pro	Ile	Thr	Pro	Asp	Asp
				130				135				140			
Leu	Arg	Arg	Gln	Ser	Leu	Val	Phe	Ser	Tyr	Leu	Asp	Val	Asp	Val	Glu
				145				150				155			
Ser	Ile	Asp	Gly	Lys	Ala	His	Asp	Ile	Gln	Val	Tyr	Ala	Asp	Ile	Ser
				165				170				175			
Ala	Glu	Trp	Val	Ser	Gly	Asp	Arg	Asn	Ala	Ile	Ala	Gln	Trp	Asp	Tyr

180										185										190																			
Gly	Val	Thr	Asp	Asp	Gly	Val	Ala	Tyr	His	Lys	Val	Tyr	Arg	Gln	Thr																								
195										200										205																			
Gln	Leu	Leu	Phe	Ser	Glu	Asn	Thr	Glu	Gln	Ala	Glu	Trp	Gly	Glu	Trp																								
210										215										220																			
Tyr	Trp	Ala	Thr	Asp	Asp	Gln	Asp	Gly	Leu	Thr	Tyr	Gln	Ser	Gly	Pro																								
225										230										235										240									
Asp	Val	Asp	Val	Arg	Gly	Ala	Phe	Ala	Lys	Asn	Gly	Lys	Leu	Val	Asn																								
245										250										255																			
Ser	Asp	Asp	Lys	Asn	Tyr	Arg	Ala	Ile	Ser	Thr	Asn	Trp	Pro	Val	Phe																								
260										265										270																			
Ala	Phe	Ser	Arg	Asp	Leu	Gly	Thr	Val	Lys	Thr	Ser	Ala	Gly	Thr	Leu																								
275										280										285																			
Phe	Ser	Ile	Gly	Leu	Ala	Gln	Asp	Ser	Ala	Ile	Gln	Tyr	Ser	Gly	Lys																								
290										295										300																			
Ala	Glu	Gly	Thr	Thr	Val	Met	Pro	Ser	Leu	Trp	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ser																								
305										310										315										320									
Thr	Ala	Thr	Ala	Ala	Leu	Glu	Phe	Phe	His	His	Asp	Tyr	Ala	Ala	Ala																								
325										330										335																			
Ala	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Leu	Asp	Asp	Arg	Ile	Ser	Lys	Asp	Ser	Ile																								
340										345										350																			
Asp	Ala	Ala	Gly	Gln	Asp	Tyr	Leu	Thr	Ile	Thr	Ser	Leu	Thr	Val	Arg																								
355										360										365																			
Gln	Val	Phe	Ala	Ala	Val	Gln	Leu	Thr	Gly	Thr	Pro	Glu	Asp	Pro	Tyr																								
370										375										380																			
Ile	Phe	Met	Lys	Glu	Ile	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Met	Asn	Thr	Val	Asp																								
385										390										395										400									
Val	Ile	Phe	Pro	Ala	His	Pro	Ile	Phe	Leu	Tyr	Thr	Asn	Pro	Glu	Leu																								
405										410										415																			
Leu	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Pro	Ile	Phe	Glu	Ile	Gln	Glu	Asn	Gly	Lys																								
420										425										430																			
Tyr	Pro	Asn	Thr	Tyr	Ala	Met	His	Asp	Ile	Gly	Thr	His	Tyr	Pro	Asn																								
435										440										445																			
Ala	Thr	Gly	Tyr	Pro	Lys	Gly	Asp	Asp	Glu	Lys	Met	Pro	Leu	Glu	Glu																								
450										455										460																			
Cys	Gly	Asn	Met	Val	Ile	Met	Ala	Leu	Ala	Tyr	Ala	Gln	Lys	Ala	Lys																								
465										470										475										480									
Asp	Asn	Asp	Tyr	Leu	Ser	Gln	His	Tyr	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Trp	Thr																								
485										490										495																			
Thr	Tyr	Leu	Val	Glu	Asp	Ser	Ile	Tyr	Pro	Ala	Asn	Gln	Ile	Ser	Thr																								
500										505										510																			
Asp	Asp	Phe	Ala	Gly	Ser	Leu	Ala	Asn	Gln	Thr	Asn	Leu	Ala	Leu	Lys																								
515										520										525																			
Gly	Ile	Ile	Gly	Ile	Gln	Ala	Met	Ala	Val	Ile	Ser	Asn	Thr	Thr	Gly																								
530										535										540																			
His	Pro	Asp	Asp	Ala	Ser	Asn	His	Ser	Ser	Ile	Ala	Lys	Asp	Tyr	Ile																								
545										550										555										560									
Ala	Arg	Trp	Gln	Thr	Leu	Gly	Val	Ala	His	Asp	Ala	Asn	Pro	Pro	His																								
565										570										575																			

Thr Thr Leu Ser Tyr Gly Ala Asn Glu Thr His Gly Leu Leu Tyr Asn
 580 585 590
 Leu Tyr Ala Asp Arg Glu Leu Gly Leu Asn Leu Val Pro Gln Ser Val
 595 600 605
 Tyr Asp Met Gln Asn Thr Phe Tyr Pro Thr Val Lys Glu Thr Tyr Gly
 610 615 620
 Val Pro Leu Asp Thr Arg His Val Tyr Thr Lys Ala Asp Trp Glu Leu
 625 630 635 640
 Phe Thr Ala Ala Ile Ala Ser Glu Ser Val Arg Asp Met Phe His Lys
 645 650 655
 Ala Leu Ala Thr Trp Ile Asn Glu Thr Pro Thr Asn Arg Ala Phe Thr
 660 665 670
 Asp Leu Tyr Asp Thr Gln Thr Gly Asn Tyr Pro Ala Gly Ile Thr Phe
 675 680 685
 Ile Ala Arg Pro Val Met Gly Gly Ala Phe Ala Leu Leu Ile Leu
 690 695 700

【0075】

<210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> N-terminal sequence of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus soja*
 e glutaminase
 <400> 5

Ala Ser Thr Phe Ser Pro Ala Arg Pro Pro Ala Leu
 5 10

【0076】

<210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Partial sequence of *A. oryzae* glutaminase
 <400> 6

Asn Gly Lys Tyr Pro Asn Thr Tyr Ala Met His Asp
 5 10

【0077】

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> Unsure
 <222> 1, 4, 6
 <223> Partial sequence of *A. oryzae* glutaminase
 <400> 7

Xaa Gly Glu Xaa Tyr Xaa Ala Thr Asp Asp Gln
 5 10

【0078】

<210> 8
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Partial sequence of A. oryzae glutaminase
 <400> 8
 Thr Tyr Gly Val Pro Leu Asp Thr Arg His Val Tyr Thr Lys Ala Asp
 5 10 15
 Trp Glu Leu Phe Thr Ala Ala Ile Ala Ser Glu Ser Val Arg
 20 25 30

【0079】

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 9
 ggy gar tgy tay tgy gcy ac
 Gly Glu Xaa Tyr Xaa Ala Thr
 5

20

【0080】

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 10
 tay tgy gcy acy gay gay ca
 Tyr Xaa Ala Thr Asp Asp Gln
 5

20

【0081】

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 11
 tgs atr gcr tar gtr ttr gg
 5

20

【0082】

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223>
 <400> 12
 ccy aay acy tay gcy aty ca
 Pro Asn Thr Tyr Ala Met His
 5

20

【0083】

<210> 13
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 13
 accgtgaggg aggtgattgt caggtagtcc

30

【0084】

<210> 14
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 14
 gagaataacg tgccagcaga cgtcttcacc

30

【0085】

<210> 15
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 15
 tgccatacag tacgatggga aacctgaagg

30

【0086】

<210> 16
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 16
 aggactacct gacaatcacc tcctcaccg t

31

【0087】

<210> 17
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 17
 atgatgcatt tcctctcggt ctgtctgtcg

30

【0088】

(210) 18
 (211) 30
 (212) DNA
 (213) Artificial Sequence
 (220)
 (223) Primer
 (400) 18

ggcgtcgact agagcgggtgt ttgagtcctg

30

【0089】

(210) 19
 (211) 29
 (212) DNA
 (213) Artificial Sequence
 (220)
 (223) Primer
 (400) 19

attgatccgg atataagatg tctgtgatg

29

【0090】

(210) 20
 (211) 30
 (212) DNA
 (213) Artificial Sequence
 (220)
 (223) Primer
 (400) 20

atgatgcatt tcctctcggtt ttgtctgtcg

30

【図面の簡単な説明】

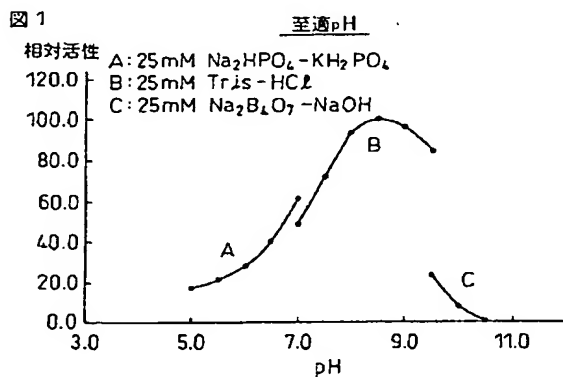
【図1】 図1は本発明のグルタミナーゼの至適pHを示すグラフである。

【図2】 図2は本発明のグルタミナーゼのpH安定性を示すグラフである。

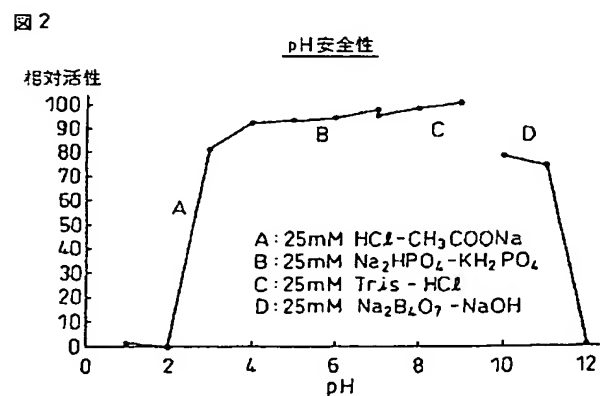
【図3】 図3は本発明のグルタミナーゼの至適温度を示すグラフである。

【図4】 図4は本発明のグルタミナーゼの温度安定性を示すグラフである。

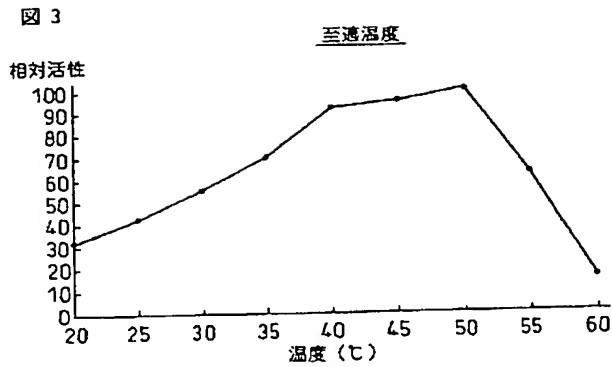
【図1】



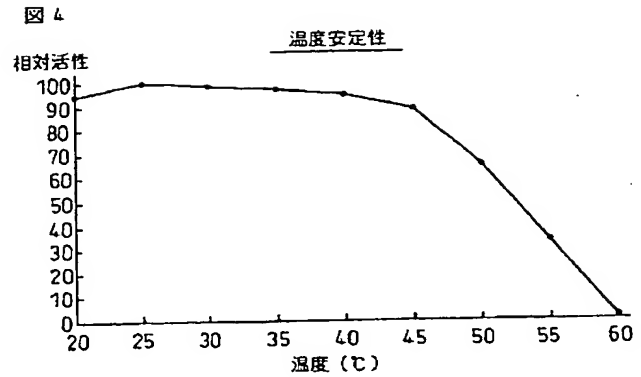
【図2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

ターコード (参考)

(C 1 2 N 9/80
C 1 2 R 1:69)
(C 1 2 N 1/15
C 1 2 R 1:69)
(C 1 2 N 15/09
C 1 2 R 1:66)
(C 1 2 N 15/09
C 1 2 R 1:69)

Z N A

Z N A

(72) 発明者 北本 則行
愛知県名古屋市守山区大字下志段味字風越
1931番地の1
(72) 発明者 吉野 庄子
愛知県名古屋市守山区金屋二丁目280番地
(72) 発明者 伊藤 蒼
愛知県豊橋市東小鷹野3-15-9 シティ
ハイツ明105

(72) 発明者 畔柳 孝
愛知県豊橋市中岩田2-4-21 ハイカム
ール中岩田B-102
(72) 発明者 竹田 加代子
愛知県海部郡美和町北苅上深坪57
Fターム(参考) 4B024 AA05 BA11 CA04 DA11 HA01
4B050 CC03 DD03 FF09E FF11E
FF12E LL02
4B065 AA60X AA60Y AA63X AA63Y
AB01 CA31 CA42

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.